

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-076600

(43)Date of publication of application : 20.03.1995

(51)Int.Cl.

C07K 16/18
C12N 5/10
C12P 21/08
// C12N 15/02
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 06-144396

(71)Applicant : KAO CORP

(22)Date of filing : 27.06.1994

(72)Inventor : SHIMOTORU REI
NOJIRI HIROSHI
NAITO YUKIO
IMOKAWA GENJI

(30)Priority

Priority number : 05174359 Priority date : 14.07.1993 Priority country : JP

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA CAPABLE OF PRODUCING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a monoclonal antibody, useful for analyzing a high-order structural change of hair proteins occurring in a process of keratinization or damage or as a damage sensor, etc., for the hair and applicable to a hair damage restoring agent or a hair cosmetic by combination thereof with other existing substances.

CONSTITUTION: This monoclonal antibody is against a keratinized hair shaft part. The antibody is obtained by fusing a cell capable of producing antibody of a mammal immunized with hair powder obtained from the keratinized hair shaft part to a cell of a myeloma in a mammal, constructing a hybridoma, culturing the resultant hybridoma in a culture medium and separating the prepared monoclonal antibody from the culture supernatant. The monoclonal antibody is capable of recognizing a protein high-order structure present in the keratinized hair shaft part and the presence of the recognition thereof entirely varies with a difference in chemical structure or damage degree of the hair used in preparing the monoclonal antibody.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-76600

(43)公開日 平成7年(1995)3月20日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/18		8318-4H		
C 1 2 N 5/10				
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9050-4B	15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 7 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平6-144396	(71)出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(22)出願日	平成6年(1994)6月27日	(72)発明者	下豊留 玲 栃木県芳賀郡市貝町大字赤羽2606-6 花 王赤羽寮B-308号
(31)優先権主張番号	特願平5-174359	(72)発明者	野尻 浩 栃木県宇都宮市築瀬4丁目3番3号104
(32)優先日	平5(1993)7月14日	(72)発明者	内藤 幸雄 茨城県つくば市花室1463-1
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(72)発明者	芋川 玄爾 栃木県宇都宮市氷室町1022-89
		(74)代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマ

(57)【要約】

【構成】 角化後の毛幹部に対するモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマ。

【効果】 この本発明のモノクローナル抗体は、角化後の毛幹部に存在する蛋白高次構造を認識し、しかもモノクローナル抗体作製の際に用いた毛髪の化学的構造の違いや、損傷度の違いによってその認識の有無も全く異なる。従ってこのモノクローナル抗体は、角化又は損傷の過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造変化の解析用や、毛髪のダメージセンサー等として有用であると共に、他の既存物質と組合せることにより、毛髪損傷修復剤又は毛髪化粧料としても応用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 角化後の毛幹部に対するモノクローナル抗体。

【請求項 2】 角化後の毛幹部より得られた毛髪粉体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髓腫細胞とを融合して得られるハイブリドーマにより産生されるものである、請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】 請求項 1 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 4】 角化後の毛幹部より得られた毛髪粉体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髓腫細胞との融合により得られるものである、請求項 3 記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は、モノクローナル抗体、更に詳細には、角化後の毛幹部を認識し、角化又は損傷の過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造変化の解析用や、毛髪のダメージセンサー等として有用なモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。

【0002】

【従来の技術】 毛髪は表皮由来の構造物である。毛髪の形成は上皮細胞由来の毛包と呼ばれる器官内で行われる。毛包の基底部は間葉細胞由来の毛乳頭を包み込むようにしてこれと接しており、毛球部と呼ばれている。また、毛球下半部において急速に分裂する未分化細胞を毛母細胞という。分裂、増殖した毛母細胞は連続的に毛球上半部に移動し、形態的（縦軸方向に細長くなる）、生理的（ケラチンと呼ばれる硬蛋白質を多量に蓄積）に分化する。分化した細胞は更に毛包上部の角化帯と呼ばれる領域へ移動する。ケラチン分子内にはシステイン残基が多く、角化帯において、ケラチン分子内、あるいは分子間にシステイン結合（システイン残基間の S-S 結合）が多量に生じ、ケラチン繊維が形成される。ケラチン繊維が細胞内に充満、その結果細胞内小器官は崩壊、排除され、毛髪は非常に強固な構造体となる。

【0003】 角化帯において細胞内にケラチン繊維が充満、細胞内小器官が消失、細胞が死滅、乾燥することにより毛髪が強固な構造となることを毛髪の角化という。当該角化領域において、細胞中の蛋白質（主にケラチン蛋白質）が分子内あるいは分子間にジスルフィド結合やγ-グルタミルリジン結合が生じ、架橋されることにより毛髪は非常に強固な構造となるが、毛幹の伸長に伴って、パーマやブリーチといった各種化学処理をほどこすと、上記架橋構造の部分的開裂などが生じ、蛋白質の高次構造は更に変化する。このような毛髪蛋白質の高次構造や化学処理による構造変化は毛髪のもつ性質、形状と深く関係し、場合によっては毛髪の損傷につながることもある。

【0004】 毛髪物質の制御や、損傷毛髪の髪質改善、更に毛髪角化機構の解明のためには、角化や化学処理による損傷の過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造の微妙な変化を詳細に解析することが必要である。しかしながら、毛髪は雑多な蛋白質の集合体であり、現在のところその蛋白質構造の解析のための有効な方法はない。

【0005】 一方、抗体はアミノ酸数残基～十数残基に相当する一定の構造部位（エピトープ）を認識し、そこに特異的に結合する。抗体の抗原に対する親和性はこのエピトープの変化あるいは修飾により変化する。従って、抗体の分子識別能を利用して毛髪蛋白質の構造解析を行うためには、毛髪蛋白質の一定の高次構造に対して特異性を有する抗体が多数必要となる。

【0006】 また、ポリクローナル抗体は抗原に対する親和性が高く、免疫動物の血液や卵黄から容易かつ多量に調製することが可能であるが、エピトープ及び親和性が異なる単離不可能な多種類の抗体分子の不均一な集合である。一方、モノクローナル抗体は 1 種類の抗体分子の集合であり、抗原内の一定のエピトープを認識する。雑多な蛋白質の集合体である毛髪中の一定の部位の構造や変化の解析には前者よりも後者の方が有用である。

【0007】 これまでに、毛髪の可溶性蛋白質を抗原として用いてモノクローナル抗体が作製され、これが毛髪の免疫組織化学的解析において、毛包未角化部や毛根鞘に対して反応することが報告されている。また、毛髪粉体を抗原として鶏の卵黄より作製されたポリクローナル抗体である卵黄抗体は、角化後の毛幹部に反応することが知られている。しかしながら、角化後の毛幹部に対して反応するモノクローナル抗体、及びその作製方法については何ら報告がないのが現状である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従って、毛髪の毛幹部に対して反応性を有し、毛髪蛋白質の高次構造やその変化の解析用や、毛髪のダメージセンサーあるいは毛髪化粧料などとして用いることのできるモノクローナル抗体が望まれていた。

【0009】

【課題を解決するための手段】 かかる実情において、本発明者らは鋭意検討を行った結果、角化後の毛幹部より得られた毛髪粉体を免疫原として角化後の毛幹部に対するモノクローナル抗体を取得することに成功し、本発明を完成した。

【0010】 すなわち、本発明は角化後の毛幹部に対するモノクローナル抗体及びこれを産生するハイブリドーマを提供するものである。

【0011】 本発明のモノクローナル抗体は、角化後の毛幹部より得られた毛髪粉体で免疫した哺乳動物の抗体産生細胞と、哺乳動物の骨髓腫細胞とを融合して得られるハイブリドーマにより産生される。

【0012】 本発明において免疫原として用いられる毛

髪粉体としては、健全毛もしくはパーマ等による損傷毛の全毛髪又は毛小皮、毛皮質等の毛髪構成組織を長さ100 μ m以下にまで粉碎した粉体（毛髪粉体）、又は毛髪粉体にパーマ等の化学処理を施したものをを用いることができる。

【0013】毛髪粉体を製造する方法としては、特開昭57-163392号公報の記載に従って、毛髪を水で膨潤した後凍結粉碎する方法や、毛髪を臭素化リチウムや尿素、塩酸グアニジン等の蛋白質変性剤で処理して膨潤した後凍結粉碎し、液体窒素下で乳鉢、サンドミル等、既存の粉碎機により粉碎する方法があるが、これらの方法に限らず、他の方法に従っても差し支えない。また、毛髪の構造組織としては、毛小皮、毛皮質、毛髄があるが、毛小皮の粉体は1cm以下に切断した毛髪をテフロン球とともに滅菌水中に振盪し、機械的に剥離することによって得ることができる。更に、毛皮質の粉体はヴァンティアン処理（特開昭55-39702号公報）等により、毛小皮を除去した毛髪を前述の毛髪の粉碎法に準じて得ることができる。

【0014】次いで、得られた毛髪粉体を免疫原として用い、常法に準じて抗体産生細胞を調製する。すなわち、まず免疫原としての毛髪粉体を哺乳動物に免疫する。ここで免疫する哺乳動物は、後の操作において細胞融合に使用する骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが好ましく、マウス、ラットなどが具体例として挙げられる。特に、ヒト毛髪蛋白質と他の哺乳動物の体毛の蛋白質とは相同性が高く、本発明において免疫原として使用する毛髪粉体の免疫原性は極めて低いため、自己免疫疾患動物を用いることが好ましい。使用可能な自己免疫疾患動物として、NZB、NZW、NZBW F₁、MRL/l、BXS B雄、SL/Ni等の自己免疫疾患マウスを挙げることができる。

【0015】また、免疫する哺乳動物としてグラム陰性菌脂質多糖体（LPS）、デキストラン硫酸等のポリクローナルB細胞活性化剤（PBA）を投与することにより自己抗体産生能を高めさせたBalb/c等のマウスを自己免疫疾患状態にして用いることもできる。

【0016】上記の免疫原を哺乳動物に免疫する方法としては、例えば毛髪粉体単独又は2種以上を組合せ、これを哺乳動物に皮下注射、腹腔内注射、血管内注射、筋肉注射、脾臓内注射などによる方法や、飼料又は水に加え、これと共に経口的に投与、免疫する方法等の通常の方法が採用できる。また、免疫する際に、必要に応じてアジュバントと併用することもできる。

【0017】次に、免疫動物から採取した脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞と融合させる。免疫動物として自己免疫疾患マウスを用いた場合、IgG型抗体を効率的に得るためには脾臓細胞の採取時期を4～8ヶ月齢、好ましくは6ヶ月齢以降とするのが好ましい。骨髓腫細胞としては既に公知の種々の細胞、例えば、NS-1、SP-

2、X63、6、5、3、P3-U1等を用いることができる。融合方法は、公知の手法に準じて行うことができる。また、融合促進剤としてポリエチレングリコール（PEG）、センダイウィルス（HVJ）等を用いることができる。脾臓細胞と骨髓腫細胞との混合比は1:1～10:1が好ましい。場合によっては、電気融合法等により細胞融合を行ってもよい。

【0018】細胞融合した後、通常の使用培地で培養することによりハイブリドーマを選択的に得ることができる。例えば、前記した骨髓腫細胞はHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む）中では生育できないためHAT培地を使用し、当該培地中で生育する細胞を選択すればよい。ハイブリドーマのコロニーが十分に大きくなったところで目的とする抗体を産生する株の検索及びクローニングを行う。抗原に特異的な抗体の検索は、一般に抗体の検出に用いられている方法、例えば、ELISA法、RIA法等により行うことができる。また、クローニングは限界希釈法や軟寒天法により行うことができる。この際、フィーダーとしてマウス胸腺細胞や腹腔マクロファージ、あるいはこれらと同様の効果を有する公知の添加剤を用いることが好ましい。

【0019】かくして得られた本発明のハイブリドーマは、液体窒素内で長期保存が可能である。

【0020】本発明のハイブリドーマを用いて本発明のモノクローナル抗体を得るには、ハイブリドーマを培地中で培養し、培養上清から分離するか、あるいはハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、その腹水を回収すればよい。更に得られたモノクローナル抗体は、常法に従って、例えば硫酸沈澱、ゲル濾過、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどを用いて精製することもできる。

【0021】本発明において抗原として用いる毛髪粉体は、化学反応による毛髪蛋白質の可溶化処理を行っていない為に毛髪蛋白質の高次構造が保存されている。従って、本発明のモノクローナル抗体は角化が終了した毛幹部に存在する蛋白質高次構造を認識することができる。また、パーマやブリーチ等の各種化学処理によって損傷を受けた毛髪から調製した毛髪粉体を抗原として用いれば、損傷を受けていない毛幹部に存在する蛋白高次構造は認識せずに、損傷を受けた毛幹部に存在する蛋白高次構造を認識し、そこに強固、かつ特異的に結合するモノクローナル抗体を作製することもできる。よって本発明のモノクローナル抗体は角化あるいは損傷の過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造変化の解析に有用である。また、損傷毛髪の蛋白質構造に特異的なモノクローナル抗体は毛髪のダメージセンサーとして利用できる。更に、他の既存物質と組合せることにより、毛髪損傷修復剤あるいは毛髪化粧料として応用することもできる。

【0022】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体は、角化後

の毛幹部に存在する蛋白高次構造を認識し、しかもモノクローナル抗体作製の際に用いた毛髪の化学的構造の違いや、損傷度の違いによってその認識の有無も全く異なる。従ってこのモノクローナル抗体は、角化又は損傷の過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造変化の解析用や、毛髪のダメージセンサー等として有用であると共に、他の既存物質と組合せることにより、毛髪損傷修復剤又は毛髪化粧料としても応用することができる。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【0024】実施例1

(1) 毛髪粉体の調製：健常毛髪又はパーマ処理毛髪をヘキサソリン洗浄後、11M 臭素化リチウム水溶液に浸し、湯煎にて90℃で90分間処理して膨潤させ、ゴム状に変性させた。ナイロン網にて処理毛髪から余分な液を除去し、予め冷却しておいた乳鉢中に移し、液体窒素にて凍結した。次いで液体窒素を適宜補いながら凍結した状態で乳鉢にて3時間粉碎し、得られた粉碎毛髪を遠心管に移し、イオン交換水にて臭素化リチウムを毛髪から洗い出した。洗浄した毛髪粉体は遠心して集め、これを3回繰り返し、毛髪から臭素化リチウムを完全に洗い流した。本処理により毛髪は100μm以下にまで粉碎された。次に、この粉碎物から更に微細な粉体を選別した。すなわち上記の粉碎物を遠心管内にてイオン交換水中で激しく振盪して分散し、その後10分間静置した。この時大きな粉体は沈殿するが、微細な粉体は上清中に分散したままなので、この上清を採取した。残った沈殿からは更に同様の操作を繰り返して微細粉体を含む上清を得た。そして遠心にて上清から微細粉体を集めた。更に微細にするために微細粉体を1%にて蒸留水中に分散し、フレンチプレスを使って2000psiの圧力で3回粉碎した。微細粉体は凍結乾燥にて回収した。本処理により、毛髪は10μm以下にまで粉碎された。健常毛髪、パーマ処理毛髪より得られた粉体をそれぞれ健常毛髪粉体、パーマ毛髪粉体とした。

【0025】(2) 免疫法：上記の方法により調製した健常毛髪粉体を生理食塩水に0.4% (w/v) の濃度で懸濁し、同量のフロイント完全アジュバント (FCA) と10分間混合し、免疫用エマルジョンを調製した。Balb/c (雌、8週齢) の腹腔内にこの免疫用アジュバント500μl (毛髪粉体1mg/マウス) を注入した。21、27、38日後に同様の方法で追加免疫を行った。但し、最終免疫においてはFCAを用いず、0.4% (w/v) 健常毛髪粉体懸濁液250μlを腹腔内に注入した。

【0026】(3) 細胞融合：最終免疫の3日後、免疫を行ったBalb/cより脾臓細胞を摘出し、RPMI 1640培地にて洗浄した。一方、対数増殖期にあるマ

ウス骨髓腫細胞P3/NS1/1-Ag4-1を集めRPMI 1640培地で洗浄した。脾臓細胞1~2×10⁸の浮遊液とマウスミエロマ2×10⁷の浮遊液を混合し、遠心分離にて培地を除去した。混合した細胞に、37℃に加温した50%ポリエチレングリコール4000-RPMI 1640培地1mlを1分間かけて徐々に加え、1分間穏やかに攪拌して融合を行った。RPMI 1640培地10mlを5分間かけて穏やかに攪拌しつつ添加した。遠心分離にて培地を除去し、細胞に5×10⁶マウス胸腺細胞/ml含有HAT培地(15%牛胎児血清、1×10⁻⁴Mヒポキサンチン、4×10⁻⁷Mアミノプテリン、1.6×10⁻⁵Mチミジンを含むRPMI 1640培地)を脾臓細胞5×10⁶/mlになるように加えた後、96穴プレートに1穴当たり0.1mlずつ分配した。4日後、HAT培地0.1mlを各ウェルに加えた。培養2週間後、60%以上のウェルにハイブリドーマの生育が認められた。

【0027】(4) ハイブリドーマの選択：ハイブリドーマ培養上清中の抗体の検索は、抗原として上記の調製法で得た健常毛髪粉体を用いてELISA変法にて行った。健常毛髪粉体を1.5%正常ウサギ血清含有磷酸緩衝生理食塩水(PBS-NRS)に0.2% (w/v) で分散し、これを予めPBS-NRSでブロッキングした96穴マルチプレート(蛋白質低吸着性のメンブレンフィルターを底部にシールしたプレート、マルチスクリーンGVフィルトレーションプレート、ミリポア社製)に各ウェルに50μlずつ分注し、液を吸引廃棄した。培養2週間後の培養上清100μlを各ウェル内の抗原と反応させた。更にパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を反応させ、発色剤として2,2'-アジノービス(3-エチルベンチアゾリン-6-スルホン)クアジッド)ジアンモニウム(ABTS)を用いて405nmにおける吸光度を測定することにより抗体価を測定した。その結果、健常毛髪粉体と反応する抗体が、4個のウェルに検出された。得られたハイブリドーマはHAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に移して培養した後、限界希釈法によりクローニングした。すなわち、胸腺細胞1×10⁷/ml、15%牛胎児血清含有RPMI 1640培地を用いて、96穴マルチプレートに1穴当たり1個の密度に細胞を希釈して培養した。コロニー出現後、ELISA変法にて抗体産生細胞を選択した。クローニングを更に繰り返し、4株の安定なハイブリドーマNH1~4を得た。マウスモノクローナル抗体サブタイピングキット(アマシャム社製)により、作製したモノクローナル抗体のクラスは、全てIgM、κ型と決定された。

【0028】実施例2

(1) 免疫法：実施例1で示した方法と同様にして調製した健常毛髪粉体を生理食塩水に2% (w/v) の濃度で懸濁し、同量のフロイント完全アジュバント (FCA

A)と10分間混合し、免疫用エマルジョンを調製した。NZBWF₁ (雌、8週齢)の腹腔内にこの免疫用アジュバント100 μ l (毛髪粉体1mg/マウス)を注入した。19、30、74、87、117日後に同様の方法で追加免疫を行った。但し、最終免疫においてはFCAの代わりにフロイント不完全アジュバント(FIA)を用いた。

【0029】(2)免疫マウス血漿中の抗体価の測定：最終免疫の2日後、上記免疫マウスより調製した血漿をPBSで50～800倍に段階希釈し、血漿希釈液を調製した。免疫を行ったマウスの血漿中の抗体価の測定は、実施例1のハイブリドーマの選択において培養上清の代わりにこの血漿希釈液を用いる他は、これと同様の方法にて行った。

【0030】(3)細胞融合：最終免疫の3日後、上記抗体価の測定において血漿中の抗体価が最も高かったマウス2個体より脾臓細胞を摘出し、RPMI1640培地にて洗浄した。一方、対数増殖期にあるマウス骨髓腫細胞P3X63-Ag. 8. 6. 5. 3を集めRPMI1640培地で洗浄した。脾臓細胞2 \times 10⁸の浮遊液とマウスミエローマ4 \times 10⁷の浮遊液を混合し、遠心分離にて培地を除去した。混合した細胞に、37℃に加熱した50%ポリエチレングリコール4000-75mM

HEPES緩衝液1.5mlを1分間かけて徐々に加え、1分間穏やかに攪拌して融合を行った。RPMI1640培地10mlを5分間かけて穏やかに攪拌しつつ添加した。遠心分離にて培地を除去し、細胞に5 \times 10⁶マウス胸腺細胞/ml含有HAT培地(20%牛胎児血清、基礎培地としてイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)を用いる他は実施例1と同様の組成)75mlを加えた後、96穴プレートに1穴当たり0.1mlずつ分配した。4日後、HAT培地0.1mlを各ウェルに加えた。培養2週間後、80%以上のウェルにハイブリドーマの生育が認められた。

【0031】(4)ハイブリドーマの選択：ハイブリドーマ培養上清中の抗体の検索は、実施例1に示したのと同様の方法にて行った。その結果、健常毛髪粉体と反応する抗体が、10個のウェルに検出された。得られたハイブリドーマをHT培地に移して培養し、培養上清中の抗体をパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体(抗IgG抗体)又はビオチン標識ヤギ抗マウスIgM抗体(抗IgM抗体)を用いるELISA変法により検出した。抗IgM抗体を用いた場合、(アビジン-ビオチン標識パーオキシダーゼ)複合体と反応させた後、発色反応を行った。その結果、抗IgG抗体では検出されるが、抗IgM抗体ではほとんど検出されない抗体が1つのウェルに検出された。10%BM-Condiment H1(ペーリンガー・マンハイム山之内社製)、10%牛胎児血清含有IMDM培地を用いて限界希釈法によるクローニングを繰り返し、安定なハイブリドーマnH

P14H6株を得た。この細胞の生産するモノクローナル抗体nHP14H6は、実施例1に示したのと同様の方法により、IgG2a、 κ 型と決定された。

【0032】(5)抗原特異性：上記調製法により得られた健常毛髪粉体又はパーマ毛髪粉体を抗原としてELISA変法を行った。PBS-NRSでブロッキングした各抗原100 μ gを予めPBS-NRSでブロッキングしておいたマルチスクリーン-GVフィルトレーションプレート(ミリポア社製)の各ウェルに入れ、ハイブリドーマ培養上清をPBSで段階希釈した液を反応させ、更にパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を反応させた。反応混合液はABTSを発色剤とし、405nmにおける吸光度を測定した。その結果を図1に示した。図1より、本発明のモノクローナル抗体はパーマ毛髪粉体よりも健常毛髪粉体に対して高い反応性を有することが分かる。従って、本発明のモノクローナル抗体はパーマ処理による毛髪蛋白質の高次構造変化の解析に有用であり、また各種化学処理による毛髪のダメージセンサーとしても利用できる。

【0033】(6)抜去毛髪切片の免疫組織学：予め冷メタノールにて固定、PBS-NRSにてブロッキングしておいたヒト抜去毛髪切片に、ハイブリドーマ培養上清をPBSで10倍希釈し、反応させた。次に、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識ヤギ抗マウスIgG抗体を反応させ、抗体の毛髪切片上における反応部位を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、本発明のモノクローナル抗体は角化初期以降の毛小皮及び角化領域の毛皮質に反応することが分かった。従って、本発明のモノクローナル抗体は角化過程で起こる毛髪蛋白質の高次構造変化の解析に有用であるばかりでなく、他の既存物質と組合せることにより毛小皮をターゲットとした毛髪損傷修復剤あるいは毛髪化粧料として応用できる。

【0034】実施例3

(1)(i)パーマ毛髪粉体の調製：実施例1の(1)と同様の方法によって調製した。

(ii)健常毛皮質粉体の調製：健常毛髪をヘキサソール洗浄後、塩酸でpH6.5に調整したアンチホルミンに浸し、室温で50秒間処理した。十分に水洗した後、アンモニア水でpH9に調整した0.5%ピロ亜硫酸ナトリウム水溶液に浸し、室温で3分間処理した。温水で十分に洗浄後、風乾し、毛小皮を毛髪より剥離させ、毛小皮を除去した。上記の方法により毛小皮を除去した毛髪6gを実施例1と同様の方法により10 μ m以下にまで粉碎し、健常毛皮質粉体とした。

(iii)健常小皮粉体の調製：健常毛髪2gをヘキサソール洗浄後、1cm長に切り、500ml容坂口フラスコに入れた。100mlイオン交換蒸留水中、直径12.7mmと16.0mmのテフロン球各10個とともに往復式振盪培養器を用い、室温で24時間、120rpmで振盪した。本

処理により毛小皮を機械的に毛髪より剥離させ、ナイロン網にて毛髪を除去した後、白濁液を遠心分離した。得られた白色沈澱を凍結乾燥し、健常毛小皮粉体を得た。

【0035】(2) 免疫法：上記の方法により調製したパーマ毛髪粉体、健常毛皮質粉体及び健常毛小皮粉体を生理食塩水に2% (w/v) の濃度で懸濁し、同量のフロイント完全アジュバント (FCA) と10分間混合し、免疫用エマルジョンを調製した。NZBWF 1 (雌、9週齢) の腹腔内にこの免疫用アジュバント 100 μ l (毛髪粉体 1mg/マウス) を注入した。以後3週おきに計6回の追加免疫を行った。

【0036】(3) 免疫マウス血漿中の抗体価の測定：6回目の追加免疫26日後、上記免疫マウスより調製した血漿をPBSで50~800倍に段階希釈し、血漿希釈液を調製した。免疫を行ったマウスの血漿中の抗体価の測定は、実施例1のハイブリドーマの選択において培養上清の代わりにこの血漿希釈液を用いる他は、これと同様の方法にて行った。

【0037】(4) 細胞融合：上記抗体価の測定において血漿中の抗体価が最も高かったマウス1個体に最終免疫を行った。但し、最終免疫においてはFCAの代わりにフロイント不完全アジュバント (FIA) を用いた。最終免疫の3日後、このマウスより脾臓細胞を摘出し、RPMI 1640培地にて洗浄した。一方、対数増殖期にあるマウス骨髄腫細胞 P3 \times 63-Ag. 8. 6. 5. 3を集めRPMI 1640培地で洗浄した。脾臓細胞

1 \times 10⁸の浮遊液とマウスミエローマ 2 \times 10⁷の浮遊液を混合し、遠心分離にて培地を除去した。混合した細胞に、37℃に加温した50%ポリエチレングリコール 4000-75mM HEPES緩衝液 1. 5mlを1分間かけて徐々に加え、1分間穏やかに攪拌して融合を行った。RPMI 1640培地 10mlを5分間かけて穏やかに攪拌しつつ添加した。遠心分離にて培地を除去し、細胞に5 \times 10⁶マウス胸腺細胞/ml含有HAT培地 (実施例2と同様の組成) 100mlを加えた後、96穴プレートに1穴当たり0. 1mlずつ分配した。4日後、HAT培地 0. 1mlを各ウェルに加えた。

【0038】(5) ハイブリドーマの選択：ハイブリドーマ培養上清中の抗体の検索は、実施例1及び2に示したのと同様の方法にて行った。各種抗原 (健常毛髪粉体、パーマ毛髪粉体、健常毛皮質粉体、健常毛小皮粉体のいずれか) に対する抗体活性の検出されたウェルについて10% BM-Condimed H1 (ベーリンガーマンハイム山之内社製)、10%牛胎児血清含有 IMDM培地を用いて限界希釈法によるクローニングを繰り返して、安定なハイブリドーマ9株を得た。

【0039】上記ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体及びそのタイプ並びに実施例2記載の免疫組織学的手法を用いた該モノクローナル抗体の認識部位を表1に示す。

【0040】

【表1】

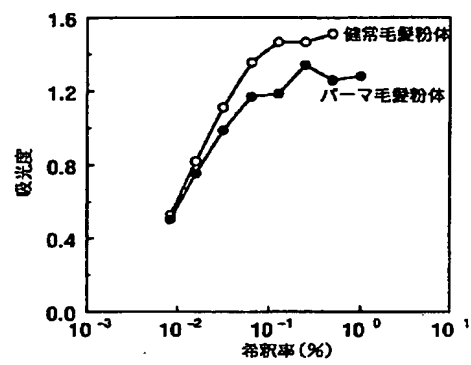
免疫原	モノクローナル抗体	サブクラス (タイプ)	認識部位
パーマ毛髪粉体	pHP76	IgM, κ	パーマ毛髪の毛小皮、毛皮質
パーマ毛髪粉体	pHP119	IgM, κ	パーマ毛髪の毛小皮、毛髄
パーマ毛髪粉体	pHP261	IgM, κ	パーマ毛髪の毛小皮、毛皮質
パーマ毛髪粉体	pHP449	IgG2a, κ	パーマ毛髪の毛皮質
健常毛皮質粉体	nCoP22	IgM, κ	健常毛髪の毛小皮、毛皮質
健常毛皮質粉体	nCoP25	IgG2b, κ	健常毛髪の毛皮質
健常毛皮質粉体	nCoP30	IgM, κ	健常毛髪の毛皮質
健常毛小皮粉体	nCnP2	IgM, κ	健常毛髪の毛小皮、毛髄
健常毛小皮粉体	nCnP5	IgG2b, κ	健常毛髪の毛皮質

【0041】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られたモノクローナル抗体の健常毛髪及びパーマ毛髪に対する反応性を示す図面である。

【図 1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
// C 1 2 N 15/02
(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所